



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/31544
G01N 33/68, 33/533			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 2. Juni 2000 (02.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09052		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, IL, JP, KR, NO, NZ, SG, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. November 1999 (23.11.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 54 196.1 24. November 1998 (24.11.98) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): XERION PHARMACEUTICALS GMBH [DE/DE]; Fraunhofer Strasse 9, D-82152 Martinsried (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ILAG, L., Leodevico [PH/DE]; Hirsch-Gereuth-Strasse 56, D-81369 München (DE). NG, Jocelyn, H. [PH/DE]; Hirsch-Gereuth-Strasse 56, D-81369 München (DE).			
(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).			

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING AND IDENTIFYING FUNCTIONAL SITES IN PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR MODIFIKATION UND IDENTIFIKATION FUNKTIONELLER STELLEN IN PROTEINEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for identifying one or more functional sites in proteins. Said method is characterized by the following steps: a) contacting the target protein with a binding partner (BP tag) linked with a laser-activatable marker (tag), resulting in a complex consisting of target protein and BP tag, b) irradiating the complex consisting of target protein and BP tag with laser light, resulting in the formation of free radicals which selectively modify the bound target protein at the binding site, and c) identifying the selectively modified region of the protein by a combination of protein cleavage and mass spectrometry. The invention further relates to a device for carrying out the inventive method.

SCHEMATIC REPRESENTATION OF THE IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL SITES IN PROTEINS

Schematische Darstellung der Identifikation funktioneller Stellen in Proteinen

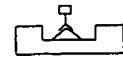
LABELING THE SELECTED LBPs WITH THE TAG

1. Markierung des ausgewählten LBPs mit dem Tag



COMBINATION OF THE LBP TAG WITH THE LIGAND

2. Kombination des LBP-Tag mit dem Liganden



EXPOSITION OF THE COMPLEX WITH OR WITHOUT LASER

3. Exposition des Komplexes mit oder ohne Laser



REMOVING THE LIGAND FROM THE LBP TAG

4. Abrennen des Liganden von dem LBP-Tag



CLEAVAGE OF THE LIGAND INTO PEPTIDE FRAGMENTS

5. Spaltung des Liganden in Peptidfragmente



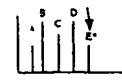
MASS SPECTROMETRY AND IDENTIFICATION OF THE MODIFIED PEPTIDE FRAGMENTS

6. Massenspektrometrie und Identifikation der modifizierten Peptidfragmente



DE NOVO SEQUENCING OF THE MODIFIED PEPTIDE FRAGMENTS AND IDENTIFICATION OF THE MODIFIED AMINO ACIDS

7. De novo-Sequenzierung der modifizierten Peptidfragmente und Identifikation der modifizierten Aminosäuren



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation einer oder mehrerer funktioneller Stellen in einem Protein, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man a) das Zielprotein mit einem mit einem laseraktivierbaren Marker (Tag) verknüpften Bindungspartner (BP-Tag) in Kontakt bringt, wobei sich ein Komplex aus Zielprotein und BP-Tag bildet; b) den Komplex aus Zielprotein und BP-Tag mit Laserlicht bestrahlt, wodurch freie Radikale erzeugt werden, die das gebundene Zielprotein an der Bindungsstelle selektiv verändern; und c) die selektiv veränderte Region des Proteins durch eine Kombination aus Proteinspaltung und Massenspektrometrie identifiziert. Ferner betrifft die Erfindung eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号
特表2002-531810
(P2002-531810A)

(43)公表日 平成14年9月24日 (2002.9.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト ⁸ (参考)
G 0 1 N 33/68	Z NA	G 0 1 N 33/68	Z NA 2 G 0 4 5
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 9
1/34		1/34	E 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/37		C 1 2 Q 1/37	
G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 27/62	V

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-584307(P2000-584307)
(86) (22)出願日	平成11年11月23日(1999.11.23)
(85)翻訳文提出日	平成13年5月23日(2001.5.23)
(86)国際出願番号	PCT/EP99/09052
(87)国際公開番号	WO00/31544
(87)国際公開日	平成12年6月2日(2000.6.2)
(31)優先権主張番号	19854196.1
(32)優先日	平成10年11月24日(1998.11.24)
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, CN, IL, JP, KR, NO, NZ, SG, US

(71)出願人	ゼリオン、ファーマスティカルズ、ゲゼルシャフト、ミット、ベシュレンクテル、ハフツング XERION PHARMACEUTIC ALS GMBH
(72)発明者	エル. レオデビコ、イラグ ドイツ連邦共和国ミュンヘン、ヒルシュ-ゲロイト-シュトラー-ゼ、56
(74)代理人	弁理士 吉武 賢次 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質において機能性部位を修飾および同定するための方法

(57)【要約】

本発明は、a) 標的タンパク質をレーザー活性化マーカー(tag)へ連結された結合パートナー(BP-tag)と接触させて、標的タンパク質およびBP-tagの複合体を形成させ、b) 標的タンパク質およびBP-tagの複合体にレーザー光を照射して、結合部位で結合標的タンパク質を選択的に変えるフリーラジカルを発生させ、およびc) タンパク質の選択的に変化した領域をタンパク質開裂および質量スペクトル測定の組合せにより同定することで特徴づけられる、タンパク質で1以上の機能性部位を同定するための方法に関する。本発明は、本発明による方法を行うための装置にも更に関する。

タンパク質における機能性部位の同定の概要

1. tagによる選択BPの標識



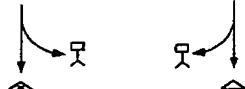
2. LP-tagとリガンドとの結合



3. 複合体へのレーザー照射又は電離



4. LP-tagからリガンドの分離



【特許請求の範囲】

【請求項1】

- a) 標的タンパク質をレーザー活性化マーカー (tag) へ連結された結合パートナー (BP - tag) と接触させて、標的タンパク質およびBP - tagの複合体を形成させ、
- b) 標的タンパク質およびBP - tagの複合体にレーザー光を照射して、結合部位で結合標的タンパク質を選択的に変えるフリーラジカルを発生させ、および
- c) タンパク質の選択的に変化した領域がタンパク質開裂および質量スペクトル測定の組合せにより同定される

ことで特徴づけられる、タンパク質で1以上の機能性部位を同定するための方法。

【請求項2】

タンパク質の選択的に変化した領域がデノボ (de novo) 配列決定により更に同定される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

タンパク質向けの結合パートナーが、dsFv、scFv、Fab、抗体、免疫グロブリン様分子、ペプチド、RNA、DNA、PNAおよび小さな有機分子から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

結合パートナーが組合せバンクから誘導される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

レーザー活性マーカーがタンパク質へ結合しうる物質であり、レーザー光照射でフリーラジカルを生じる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

マーカーが、AMCA-S、AMCA、BODIPYおよびその変種、Cascade Blue、CI-NERF、ダンシル、ジアルキルアミノクマリン、4'、5' -ジクロロ-2'、7' -ジメトキシフルオレセイン、DM-NERF、エオシン、エオシンF3S、エリトロシン、ヒドロキシクマリン、Isosulfan Blue、リサ

ミンローダミンB、マラカイトグリーン、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、NBD、Oregon Green 488、500、514、PyMPO、ピレン、Rhodamine 6G、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Rhodol Green、2', 4', 5', 7' - テトラブロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン、Texas RedまたはX - ローダミンである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

タンパク質開裂が化学的にまたは酵素で行われる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

質量スペクトル測定がタンデム質量スペクトル測定、MALDI-TOFである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

タンパク質で機能性部位を同定するために用いうる集積独立ユニット/パートの自動システムであって、下記構成：

- 特定の標的分子/リガンドに対する特異的LBPを生じるための自動LBPスクリーニング機
- 発色団を生産するための発色団合成装置
- 選択されたLBPおよび合成された発色団を連結するためのLBP-発色団カップリング装置
- アッセイプラットホームにおいて標識分子/リガンドでコートされた既定ウェル中へLBP-tagを移すための担持装置
- アッセイプラットホームをレーザーシステムへ運ぶためのトランスファーロボットアーム
- サンプルをLBP-tag/リガンド分離装置へ運ぶためのサンプルトランスファーロボット
- タンパク質開裂装置
- 質量分析計
- データベース
- 中央コンピューターシステム

を含んでなる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法を行うための装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、標的タンパク質で機能性部位の特異的修飾および同定のための方法に関する。タンパク質中における特定のアミノ酸およびそれらの機能またはタンパク質の機能の喪失／獲得に際するリガンド結合部位としてのそれらの機能と、その後における修飾アミノ酸の決定（エピトープマッピング）との間には、相関関係がある。その方法は、発色団介助レーザー不活化（C A L I）および質量スペクトル測定またはタンパク質配列決定の組合せ使用に基づいている。本発明はこの方法を行うための装置にも関する。

【0002】

組換えDNAおよびタンパク質調製の技術によれば、簡単に、タンパク質構造とタンパク質機能との関係を深く理解することができる。ランダム変異誘発の方法、特定の遺伝子選択およびスクリーニング方法は、タンパク質レベルで情報を迅速に得られるが、タンパク質の特定機能性ドメインがアミノ酸置換に対して非常に寛容であり、一部の変異誘発試薬が特定のDNA配列を優先的に攻撃して、可能な変異が制限されるという欠点を有している。そのため、これらの方法で得られる情報も限定されてしまう。

【0003】

例えばアラニンスキャニング変異誘発法のような、別の部位特異的変異誘発法では、生物学的機能にとり重要なアミノ酸を同定するより直接でより具体的な手法を提供する。この方法ではアラニンへの各アミノ酸の系統的変異があり、機能が決定される。機能の各喪失が特定のアミノ酸と関連づけられる。この技術は、関連した三次元構造も未知の機能性ドメインもないタンパク質へ適用しうる。加えて、これは各場合に1アミノ酸のみの修飾に限定され、それが複数のアミノ酸からなる特定の機能を検出しえない理由となっている。加えて、その方法は分子サイズが増すほど複雑になる。これは病気に関連した遺伝子産物の機能を分析する際の欠点であり、それはこれらが大抵多数構造ドメインを含んだ大きなタンパク質だからである。

【0004】

更に、他の組換えDNA技術もエピトープマッピングおよびリガンド結合部位マッピングに用いられ、そこでは変異がDNAレベルで導入されたランダム抗原フラグメントの発現がある (cf. J. Immunol. Meth., 141, 245-252, 1991; J. Immunol. Meth., 180, 53-61, 1995; Virology, 198, 346-349, 1994)。最近、ランダムペプチドライブラリーのファージディスプレーがエピトープマッピングに用いられた (J. Immunol., 153, 724-729, 1994; PNAS, 93, 1997-2001, 1996)。

【0005】

タンパク質の別なエピトープマッピング法は、選択ペプチドの高速自動合成 (J. Endocrinol., 145, 169-174, 1995) および組合せペプチドライブラリーの使用 (FEBS Letters, 352, 167-170, 1994) である。これら的方法は線状エピトープには信頼できるが、それらは非線状または不連続エピトープにはうまくいかなかった。オーバーラップペプチドを用いる別法も、不連続エピトープには不満足であった。これはELISAによりリガンドとの結合性について個々のペプチドまたはペプチド混合物をスクリーニングしており、遊離および結合ペプチドはそのリガンド (例えば、抗体) に対して競合する。しかしながら、この方法は煩雑で時間がかかる。

【0006】

もう1つのアプローチではタンパク質修飾および質量スペクトル測定の組合せを用いた (Anal. Biochem., 196, 120-125, 1991)。ここではリガンドがレセプターへ結合されて、その複合体が無水酢酸で修飾され、リジン残基のアセチル化をもたらす。2タンパク質のタンパク質分解混合物が質量スペクトル測定で分析されて、未処理複合体からの対応フラグメントと比較される。修飾されたリジンは容易に検出されるが、これらのリジンはその複合体で保護されておらず、未修飾リジンはリガンドとレセプターとの相互作用のうち一部に関与する。そのため、この技術はリジン残基が関与する相互作用に限定される。もう1つの方法は異なるタンパク質分解に基づき (Protein Science, 4, 1088-1099, 1995)、タンパク質分解をうけやすい部位は複合体形成後にプロテアーゼ抵抗性になる。

【0007】

抗体に結合したペプチド抗原からのパターンと比較する、遊離ペプチド抗原の

タンパク質分解産物の質量スペクトル測定による同定の記載もみられた。その同定は²⁵²Cfプラズマ脱着質量スペクトル測定により行った(PNAS, 87, 9848-9852, 1990)。免疫沈降およびマトリックス介助レーザー脱着質量スペクトル測定(MALDI-MS)の組合せの記載も更にみられた(PNAS, 93, 4020-4024, 1996)。ここでは、抗原タンパク質が小さなフラグメントへ開裂されて、対象の抗体と沈降される。免疫沈降したペプチドがMALDI-MSで同定されて、抗体結合領域が決定される。この方法では、アフィニティキャピラリー電気泳動によるタンパク質開裂ペプチドの分離および電子スプレー質量スペクトル測定(ACE-MS)による同定もあった(Anal. Chem., 69, 3008-3014, 1997)。ペプチド混合物の注入に次いで、抗体の注入が行われる。その抗体と結合するペプチドは捕捉されるため、移動しない。結合ペプチドは、そのペプチドでエピトープ残基を決定するために、消去式スクリーニング法で調べられる。しかしながら、この技術は線状エピトープに限定され、不連続エピトープには適用しえない。

【0008】

このように、本発明は記載された先行技術の問題を解消する目的に基づいている。その意図は、いかなるタンパク質のいかなる機能性部位も同定しうる方法を提供することである。好ましくは、リガンド相互作用に関与する部位、およびエピトープを同定しうることが意図されている。特に、本発明による方法はタンパク質の三次元構造の知識なしに非線状および不連続エピトープへ適用しうるべきである。分子を不活化せずにタンパク質機能の決定が可能になることも、本発明により意図されている。その方法が使用上簡単で、迅速に行われ、自動化しうることも、更に意図されている。本発明による方法を簡単に行える装置を提供することも、更に意図されている。

【0009】

この目的は、

- a) 標的タンパク質をレーザー活性化マーカー(tag)へ連結された結合パートナー(BP-tag)と接触させて、標的タンパク質およびBP-tagの複合体を形成させ、
- b) 標的タンパク質およびBP-tagの複合体にレーザー光を照射して、結

合部位で結合標的タンパク質を選択的に変えるフリーラジカルを発生させ、および

c) タンパク質の選択的に変化した領域をタンパク質開裂および質量スペクトル測定の組合せにより同定する

ことで特徴づけられる、タンパク質で1以上の機能性部位を同定するための方法、並びにその方法を行うための装置により達成される。

【0010】

意外にも、C A L I 技術と質量スペクトル測定との組合せにより、タンパク質で機能性部位の信頼しうる迅速な同定を行えることがわかった。本発明によると、標的タンパク質はそれを不活化するためにC A L I により修飾される。次いで、そのタンパク質の修飾領域が質量スペクトル測定により決定される。タンデムMSおよび／またはデノボ (de novo) 配列決定が好ましくは用いられる。これは、アミノ酸およびその生物学的機能の相関づけを、簡単な手法で行える。構造および機能のこの相関は、例えば、特定の代謝活性と分子中それに対応する部位との相関、病変したタンパク質、癌促進タンパク質などについて、情報をもたらす。望ましくない（例えば病的）タンパク質を不活化することも特に可能である。

【0011】

標的タンパク質は、複合体形成が生じてもそのタンパク質が変性されないような条件下で、最初に結合パートナーと接触される。理想的には、その条件はタンパク質の細胞環境の生理学的条件に対応する。結合パートナーはレーザーで活性化しうるマーカーへ連結される。レーザー活性化マーカーは、結合パートナー、即ちアミノ酸配列との共有または非共有結合に適したいずれかのマーカーであつて、フリーラジカルを発生しうるように活性化しうる。そのマーカーは好ましくはレーザー光で活性化されるが、ペルオキシダーゼ（過酸化水素／セイヨウワサビペルオキシダーゼ系）でも可能である。このようなマーカーの例は、AMCA-S、AMCA、BODIPYおよびその変種、Cascade Blue、C I - N E R F 、ダンシル、ジアルキルアミノクマリン、4'，5' - ジクロロ - 2'，7' - ジメトキシフルオレセイン、DM - N E R F 、エオシン、エオシンF3S、エリ

トロシン、ヒドロキシクマリン、Isosulfan Blue、リサミンローダミンB、マラカイトグリーン、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、NBD、Oregon Green 488、500、514、PyMPO、ピレン、Rhodamine 6G、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Rhodol Green、2'，4'，5'，7' - テトラブロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン、Texas RedまたはX - ローダミンである。マーカーは好ましくはマラカイトグリーンイソチオシアネート、フルオレセインイソチオシアネートまたは4'，5' - ビス(1，3，2 - チオアルソラン - 2 - イル)フルオレセインである。照射は、特定の発色団により吸収される波長のレーザー光で行う。

【0012】

結合パートナーは、適切なタンパク質向けとして、いかなる結合パートナーであってもよい。それは好ましくはscFv、Fab、抗体(diabody)、免疫グロブリン様分子、ペプチド、RNA、DNA、PNAまたは小さな有機分子である。

【0013】

結合パートナーは好ましくは組合せライブラリーから誘導される。これはいかなる組合せライブラリーでもよく、例えばタンパク質ライブラリー、ペプチドライブラリー、cDNAライブラリー、mRNAライブラリー、有機分子とのライブラリー、免疫グロブリンスーパーファミリーとのscFvライブラリー、タンパク質ディスプレーライブラリーなどである。以下がライブラリーの例示である：全タイプのタンパク質、例えば構造タンパク質、酵素、レセプター、リガンド、修飾を含めた全タイプのペプチド、DNA、RNA、DNAおよびRNAの組合せ、ペプチドとRNAまたはDNAとのハイブリッド、全タイプの有機分子、例えばステロイド、アルカロイド、天然物質、合成物質など。様々なもの、例えばファージディスプレー系（例えばM13、f1、fdなどのような纖維状ファージ、λファージディスプレー、ウイルスディスプレーなど）での提示、細菌表面、リボソームなどでの提示が行える。

【0014】

CALI技術を用いて、標的タンパク質が直接かつ特異的に不活化される (PN

AS, 85, 5454-5458, 1988; Trends in Cell Biology, 6, 442-445, 1996参照)。C A L I は、抗体または他のリガンドのような結合試薬を機能阻止分子へ変換するために用いられる。ここでは、結合パートナー (BP) が例えば色素マラカイトグリーン (MG) へ連結される。細胞成分により有意に吸収されない波長のレーザー光による照射で、この色素はフリーラジカルを発生する。この測定のために、MGへ連結されたBP (=BP-MG) が対象のタンパク質サンプルと共にインキュベートされる。不活化すべき領域が選択され、620 nmのレーザービームで照射される。この光はMGにより吸収されて、不可逆的化学修飾のために15 Åの半径でBP-MGへ結合されたタンパク質を選択的に不活化する短命のフリーラジカルを発生する。この系はインピトロおよびインピボアッセイと細胞内および外の標的分子に用いることができる。

【0015】

次いでこうして不活化されたタンパク質が開裂される。この目的のためには、残基、例えばLys-C、Glu-C、Asp-Nの後で特異的に開裂するプロテアーゼを用いることが可能である。その例はトリプシン、キモトリプシン、パパインなどである。化学的開裂は、例えば臭化シアン (Metに特異的)、3-ブロモ-3-メチル-2-(2-ニトロフェニルメルカプト)-3H-インドール (BNPS-スカトール; Trpに特異的)、2-ニトロ-5-チオシアナト安息香酸 (Cysに特異的) およびFe-EDTAでも可能である。

【0016】

開裂混合物は電気泳動により分別される。次いで、質量スペクトル測定および未処理標的タンパク質との比較により、修飾アミノ酸を評価することが可能である。

【0017】

質量スペクトル測定で極めて最近の進展からタンパク質の迅速な同定をもたらした (PNAS, USA, 93, 14440-14445, 1996)。標的タンパク質がCALIにより不活化されるとすぐに、タンデム質量スペクトル測定、適切であればデノボ配列決定により、不活化おそらく関与している不活化タンパク質の修飾アミノ酸を特定することができる (Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1015-1024, 1997; Rapid C

ommun. Mass Spectrom., 11, 1067-1075, 1997)。

【0018】

結合パートナーと本発明に従い複合化されたタンパク質の同定は、タンパク質開裂および質量スペクトル測定、適切であればデノボ配列決定の組合せにより行われる。

これにはこうして処理されたタンパク質を必要とし、マーカーを電気泳動またはクロマトグラフィーにより標的タンパク質から最初に分離して用意される。次いで単離および修飾されたタンパク質は、上記の方法により化学的にまたはタンパク質分解で開裂される。これはゲルで（即ち、分離後にゲルから標的タンパク質の直接溶出、その後タンパク質分離）または溶液で行える。ゲルでの開裂方法は公知であり、例えばAdvanced Methods in Biological Mass Spectrometry, EMB L-Laboratory, Heidelberg, 1997またはShevchenko, A., et al., Anal. Chem., 68:850-858, 1996で記載されている。

MALDI分析はそれ自体公知の手法で行われる。

【0019】

ナノ電子スプレー分析 (nanoES) では、ゲル破片からトリプシンペプチドを抽出することが必要である。これをするためには、ゲル破片が重炭酸アンモニウム、アセトニトリル、希硝酸およびアセトニトリルで連続的に洗浄される。上澄が合わされ、真空遠心機で乾燥される。サンプルが80%強度硝酸に溶解され、水で速やかに希釈され、その後脱塩される。

【0020】

質量スペクトル測定による分析は、それ自体公知の様々な手法で、例えば、ナノ電子スプレー (Wilm, M. and Mann, M., Anal. Chem. 68, 1-8, 1996)、マトリックス介助レーザー脱着およびイオン化 (MALDI) (Siuzdak, G. Mass Spectrometry for Biotechnology, Academic Press Inc. 1996) を含めた電子スプレーのようなイオン化源を用いて (Chapman, J. R., et al., Methods in Molecular biology, 61, JR Chapman editor, Humana Press Inv. Totowa NJ, USA, 1996)、またはトリプル、四重極、飛行時間型、磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴および四重極イオン捕捉のような質量分析の組合せを用いて行える。

【0021】

開裂混合物のペプチドがタンパク質で調査部位を特定する上で疑義のない確定にとり不十分であるならば、それ以上の配列情報が、質量分析計で更なるフラグメント化により、例えばMALDI-TOF、MS/MS（タンデム質量スペクトル測定）、MSⁿで対象箇所の下流における分解により得られ、そのタンパク質がデノボ配列決定で更に同定される。

【0022】

CALIでは、標的タンパク質のあるアミノ酸で光化学修飾があるため、MSはどのアミノ酸がどのように修飾されたかを特定するために2段階で用いられる。その方法は低および高分解能で行える。

低分解能では、タンパク質のセグメントが修飾されたペプチド質量マッピングにより調べることが第一に可能である (Anal. Chem., 69, 4741-4750, 1997; Biochem. Soc. Transactions, 24, 893-896, 1996; Anal. Chem., 69, 1706-1714, 1997)。第二段階では、それより高い分解能で、選択されたペプチドでタンデム質量スペクトル測定および/またはデノボ配列決定が修飾部位を調べるために用いられる。どの特定アミノ酸がCALIで修飾されたかを調べるには、0~0.03ドルトンの質量を解析しうる質量分析計の配置で可能である (Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1015-1024) (qQTOFおよび他の質量分析)；質量の増減から修飾のタイプを調べることさえ可能である。

【0023】

CALIにより生じるフリーラジカルは、His、Met、CysおよびTrpのような酸化感受性アミノ酸側鎖の修飾を行う。他のアミノ酸側鎖もありうる。酸素が付加されるため、これは質量にかなりの変化をもたらす。CALI処理フラグメントおよび未処理サンプル間の開裂後におけるペプチドフラグメントの比較で、修飾アミノ酸の大体の位置決めを行える。これらのアミノ酸はデノボ配列決定で更に正確に特定される。

【0024】

修飾の種類そのものを知ることは不要である。本発明による方法では、処理および未処理サンプル間の差異から、修飾を見分けられる。この方法の利点は、タ

ンパク質の三次元構造が未知であっても、不連続エピトープを明らかにする上で用いることである。

CAL Iにより誘導された修飾は、分析の速度を上げる親イオンスキャン (J. Mass Spectrom. 32, 94-98, 1997) のような他の方法を用いることで解明してもよい。これはCAL Iにより変化したペプチドのみを検出する。

不十分な情報が限定されたペプチドフラグメント化または疑わしい質量測定のせいで得られるならば、デノボ質量配列決定を行うことが可能である (Rapid Commun. Mass Spectrom. 11, 1015-1024, 1997)。この方法では、ペプチドは¹⁸Oで標識される。これは、マイクロ蒸留で精製された50% (vol/vol) H₂¹⁸Oを含有する開裂用緩衝液において、ゲルでトリプシン開裂することにより行われる。QqTOF質量分析計が好ましくは用いられる。明白な結果は1:1¹⁶O/¹⁸O比によるダブルエットを読むことで可能である。そのダブルエットの質量差が特定ペプチドの変化状態の指標となる。異なる電荷状態を用いて、所定ペプチドに関する配列で15以内のアミノ酸を読み取ることができる。未処理およびCAL I修飾タンパク質の¹⁸O標識スペクトルの比較から、修飾アミノ酸について疑義のない情報を得る。

【0025】

図1はタンパク質において機能性部位を同定するためのスキームを示す。

本発明は本発明による方法を行うための装置にも関する。これは図2で示されている。この装置は集積独立ユニット/パートの自動システムであり、タンパク質で機能性部位を同定するために用いる。パートAはLBP-tagの調製に関する。自動LBPスクリーニング機は特定の標識分子/リガンドに対する特異的LBPを選び出し、発色団合成装置は選択された発色団を生産する。選択されたLBPおよび合成された発色団はLBP-発色団カップリング装置で化学的に連結されて、LBP-tagを生じる。このLBP-tagは担持装置中へ移して、アッセイプラットホームにおいて標識分子/リガンドでコートされた既定キャビティ中へLBP-tagを移す。

【0026】

次いでトランスファーロボットが、第二パートBを開始させるために、アッセ

イプラットホームをレーザーシステムへ運ぶ。サンプルは、フリーラジカルによる修飾を誘導するために、必要な波長でレーザー照射される。次いで照射されたサンプルは、リガンドを単離するために、サンプルトランスマーカーロボットによりLBP-tag／リガンド分離装置へ移される。次いでリガンドがタンパク質開裂装置で開裂される。次いでペプチドフラグメントが、質量の変化を検出するために、または直接配列決定を行うために、質量分析計で分析される。次いで質量スペクトルからのデータがデータベースで分析のために用いられて、最終的にアミノ酸またはペプチドフラグメントの同定を行える。装置のすべてのパートが、コントロールおよび分析用の中央コンピューターシステムに接続されている。

本発明を下記例により詳細に説明する。

【0027】

例1

CALI-MSによる β -ガラクトシダーゼのエピトープマッピング

β -ガラクトシダーゼに対するIgG抗体をSigmaまたはCappelから購入し、PNAS, 85, 5454-5458, 1988またはPNAS, 95, 4293-4298, 1998で記載されたように、マラカイトグリーンイソチオシアネートまたはフルオレセインイソチオシアネートで標識した。こうするために、マラカイトグリーンイソチオシアネートまたはフルオレセインイソチオシアネート (Molecular Probes, Eugene, OR製) を、DMSO中ストック溶液 (20mg/mlまたは2mg/ml) から、濃度が120 μ g/mlとなるまで段階的に、NaHCO₃ (pH 9.8) 500ml中600 μ g/ml濃度の抗体へ加えた。攪拌しながら室温で1時間のインキュベートまたは氷内で4時間のインキュベート後に、標識タンパク質を遊離マーカーから分離するために、溶液をカラムにおいて150mM NaCl／50mM Na₃PO₄, pH 7.3で脱塩した (マラカイトグリーンの場合には、緩衝液を変える前に沈降物を遠心することが必要である)。

【0028】

CALIを行うためのレーザー配列およびレーザービーム照射は、本質的にMethods Cell Biol., 44, 715-732, 1994またはPNAS, 95, 4293-4298, 1998で記載されているとおりである。 β -ガラクトシダーゼ含有サンプル (10 μ g/ml) 20 μ L

および β -ガラクトシダーゼに対する色素標識抗体 (200 μ g/ml) をELIS Aプレート (Nunc) に入れた。ウェルの全量を異なる期間にわたりレーザービームで照射した。これらサンプルの活性をMeth. Enzymol., 5, 212-219, 1962で記載されているように測定した。CAL I後に、CAL I修飾 β -ガラクトシダーゼを抗体から分離するために、各サンプルを1D PAGEゲル上に置いた。

【0029】

MSのために、CAL I修飾 β -ガラクトシダーゼおよび未処理 β -ガラクトシダーゼの双方をゲルにおいてトリプシンで開裂させた (Anal. Chem., 68, 850-858, 1996; Protein Structure, A Practical Approach, 2nd edition, editor Creighton, T. E., Oxford University Press: Oxford, UK, 1997, pp. 29-57)。開裂タンパク質の一部 (0.3~0.5 μ L) をMALDI分析に用い、残部をMS/MSおよび/または電子スプレーMSによるデノボ配列決定に用いた。

【0030】

低分解能CAL I-MSでMALDI用のサンプルを調製するために、開裂タンパク質 (0.3~0.5 μ L) をMALDIサンプル担持装置で蒸着マトリックス/ニトロセルロース表面上 5~10% ギ酸の (0.3 μ L) 液滴へ液滴として加えた (c.f. Anal. Chem., 69, 4741-4750, 1997; Anal. Chem., 66, 3281-3287, 1994; J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5, 955-958, 1994; Rapid Commun. Mass Spectrom., 10, 1371-1378, 1996; Anal. Chem., 68, 850-858, 1996; Org. Mass Spectrom., 27, 156-158, 1992)。2サンプルで同一機器条件を保証するために、未処理およびCAL I修飾 β -ガラクトシダーゼのMALDI分析を直接連続的に行った。MALDI質量スペクトルで β -ガラクトシダーゼ部分配列に相当するピークを特定するために、MALDIペプチド質量マッピング (Anal. Chem., 69, 4741-4750, 1997; Biochem. Soc. Transactions, 24, 893-896, 1996; Anal. Chem., 69, 1706-1714, 1997) を未処理 β -ガラクトシダーゼで予め行った。 β -ガラクトシダーゼに属さないピークは、例えばマトリックスおよびトリプシン自己分解ピークである。更に、実際のトリプシン開裂の程度を確かめることは、理論的トリプシンペプチドのリストに基づくと可能である。

【0031】

未処理 β -ガラクトシダーゼのMALDI質量スペクトルの分析に続いてCALI修飾サンプルのスペクトルの分析を行うと、そのスペクトルの差異が、CALIで修飾されているため機能にかかわるタンパク質の領域を示した。

既に得られたMALDIに基づく選択ペプチドのタンデムMSおよびデノボ部分配列決定を高分解能CALI-MSに用いて、修飾された実際のアミノ酸を調べた。

【0032】

β -ガラクトシダーゼの結晶構造に基づき、基質結合および触媒作用に関与するアミノ酸をこうして特定した。アミノ酸Met、HisおよびTrpが触媒作用にかかわることがわかった。これらアミノ酸の質量は、質量スペクトルで未処理アミノ酸と比較すると、増加した質量のピークをもたらす。デノボ配列決定で修飾アミノ酸の存在を確かめた。

【0033】

質量増減から修飾のタイプを調べることも可能である。前記のように、2サンプルについて同一機器条件を保証するために、未処理およびCALI修飾 β -ガラクトシダーゼを連続的MALDI分析に付した。タンデムMSまたはMS/MSを、例えばNature, 379, 464-469, 1996またはBiochem. Soc. Transactions, 24, 893-896, 1996で記載されたように、ナノ電子スプレー源で行った。触媒作用にかかわるアミノ酸に関して得られた結果は、前記と同様であった。

【0034】

β -ガラクトシダーゼ活性をCALI後における時間の関数として追跡した。活性はアッセイ単位として測定し、未処理 β -ガラクトシダーゼの活性と比較して示されている。

<u>時間(min)</u>	<u>%活性β-ガラクトシダーゼ</u>	
	<u>+ CALI</u>	<u>- CALI</u>
0	100%	100%
1	100%	100%
3	75%	100%
5	22%	100%

10	5%	100%
30	< 1%	100%

【0035】

CAL Iにより不活化された β -ガラクトシダーゼを30分間に次のプロセッシングに用いた。トリプシン開裂により、MALDIで検出されるような質量の減少した配列で、下記フラグメントを生じた。位置とは、その酵素でトリプシン開裂の位置番号に関する。示された範囲は、N末端から始めた酵素のアミノ酸の番号に相当する。下線部分のフラグメントは分子質量の変化を示しており、CAL I処理後に修飾されたものに相当する。これらのフラグメントにおけるアミノ酸His、TrpおよびCysは再配列決定で確認されたように修飾されていたが、構造研究と一致しており、そのことから修飾アミノ酸が酵素活性に関与していることは明らかである。

【0036】

位置	下記の範囲	mol. wt.
43	523 - 532	146.2
60	775 - 775	146.2
68	855 - 855	146.2
2	15 - 15	174.2
57	756 - 756	174.2
37	448 - 449	289.3
65	811 - 812	332.4
35	441 - 443	374.4
26	335 - 337	402.4
75	940 - 943	435.5
69	856 - 858	438.5
28	354 - 357	444.5 : His 357 (観察された新ペプチド質量 = 460.5)
39	475 - 477	445.6
22	290 - 293	487.6

42	519 - 522	532.6
32	444 - 447	532.7
12	180 - 184	545.5
46	559 - 562	562.6
19	253 - 256	565.6
21	284 - 289	637.6
62	783 - 787	665.7
5	39 - 44	704.7
15	306 - 211	709.9
33	427 - 432	715.7
67	849 - 854	735.9
58	757 - 761	749.8
13	185 - 191	801.1
23	294 - 300	812.9
61	775 - 782	840.0
7	54 - 60	860.9
45	553 - 558	870.0
73	911 - 918	896.0
17	232 - 238	899.9
30	382 - 389	962.0 : Cys 389 (観察された)

新ペプチド質量 = 978.0

34	433 - 440	989.1
50	613 - 622	1064.2
10	159 - 167	1067.1
77	954 - 962	1083.2
64	802 - 810	1099.2
6	45 - 53	1100.2
4	28 - 38	1252.4
51	623 - 631	1265.4

76	944 - 953	1299. 4
41	507 - 518	1341. 5
24	301 - 311	1361. 5
80	1015 - 1024	1367. 6
11	168 - 179	1394. 6
49	601 - 612	1400. 6
71	883 - 895	1414. 6
3	16 - 27	1428. 5
63	788 - 801	1457. 5
59	762 - 774	1496. 7
78	963 - 974	1507. 6
18	239 - 252	1547. 8
1	1 - 14	1577. 9
52	632 - 646	1742. 9
72	896 - 910	1757. 9
27	338 - 353	1776. 2
14	192 - 205	1787. 9
47	563 - 578	1891. 2 : Trp 568 (観察された)

新ペプチド質量 = 1907. 2)

9	142 - 158	1949. 2
31	390 - 405	2005. 2 : His 391 (観察された)

新ペプチド質量 = 2021. 2)

16	212 - 231	2265. 5
32	406 - 426	2408. 7 : His 418 (観察された)

新ペプチド質量 = 2424. 7)

25	312 - 334	2416. 7
48	579 - 600	2447. 4
70	859 - 882	2466. 7
74	919 - 939	2500. 8

54	679 - 700	2517. 9
55	701 - 722	2522. 8
38	450 - 474	2744. 9
20	257 - 283	2848. 1
<u>29</u>	<u>358 - 381</u>	<u>2867. 3 : His 359 : His 36</u>
0	(観察された新ペプチド質量 = 2883. 3, 2899. 3)	
40	478 - 506	3071. 3 : Met 502 (観察された 新ペプチド質量 = 3087. 3, 3103. 3)
44	524 - 552	3132. 6
53	647 - 678	3424. 9
56	723 - 755	3524. 0
66	813 - 848	3776. 2
<u>79</u>	<u>975 - 1014</u>	<u>4325. 7 : Trp 999 (観察された 新ペプチド質量 = 4341. 7)</u>
8	61 - 141	9178. 1

【0037】

フリーラジカルが酸化を行うことが示された。そのため、上記アミノ酸の酸化は酸化状態に応じて各修飾アミノ酸で 16 da の質量増加をもたらしたが、但し Met では 32 da の増加である。修飾アミノ酸は酵素の活性部位またはその近くにあり、そのことが機能の喪失を説明している。これは、触媒作用でアミノ酸 Met 502 の役割を示す独立した研究と一致している (Arch. Biochem. Biophys., 283:342-350, 1990; J. Biol. Chem., 265:5512-5518, 1990)。

【0038】

図3および4はトリプシンβ - ガラクトシダーゼペプチドのMALDIスペクトルの一部について示している。分子量 3071. 3 のペプチド 478 - 506 が示されている。このペプチドの Met 502 は CALI で修飾されているため、質量が 3087. 3 da (スルホキシド) および/または 3103. 3 da (スルホン) で得られる。スルホンへの変換のみが図示されている。トリプシン自己分解ピークおよびマトリックスピークを含めたすべての予想されるピークが省

略されている。

【0039】

MALDIスペクトルでは、ペプチド478-506に加えて、 β -ガラクトシダーゼペプチドを表わすピークのみを示す。MALDI-MSスペクトルからの質量は、1水素原子を附加した単同位体分子質量 (MH^+) である。下記表は、そのスペクトルにおける平均および単同位体ペプチドイオン MH^+ を示している：

ペプチド位置	平均 MH^+	単同位体 MH^+
257-283	2848.1	2847.42
358-381	2867.3	2866.38
478-506	3071.3	3070.43
478-506*	3103.3	3102.41
524-552	3132.6	3131.58
647-678	3424.9	3423.74

* CALI修飾ペプチド

【0040】

MS/MSまたはデノボ配列決定スペクトルでは、ペプチド478-506のピーク ($MH^+ = 3070.43$ da) のみを示す。MS/MSを親イオンとして $m/z 1535, 215$ の二価ピーク MH^{2+} で行った。単同位体 MH^+ ピークが MALDIスペクトルの場合のように観察される。下記表はトリプシンペプチド478-506からのペプチドのリストを示している。トリプシンペプチドはいくつかのYフラグメントイオンを通常示すが、これはカルボニル炭素とアミド窒素とのアミノ酸結合の開裂に起因したC末端イオンである。ロイシンおよびイソロイシンは同一質量を有しており、区別しえない。プロリンのC末端側におけるYイオンは弱いシグナルを出すか、または全く存在しないが、プロリン自体を含む下記Yイオンは顕著なシグナルを出す。

【0041】

β -ガラクトシダーゼからのトリプシンペプチド478-506のデノボ配列決定における単同位体 MH^+ ピーク (部分リストのみ)

Ynイオン	そのイオンの配列	MH ⁺ (CAL I前)	MH ⁺ (CAL I後)
1	R	175.12	175.12
2	AR	246.16	246.16
3	YAR	409.22	409.22
4	MYAR	540.26	572.25
5	PMYAR	637.31	669.30
6	CPMYAR	740.32	772.31
7	ICPMYAR	853.41	885.40
8	IICPMYAR	966.49	998.48

【0042】

例2

RNAアプタマーの結合部位の決定

U1-snRNP-Aタンパク質におけるRNAアプタマーの結合部位を、CAL Iおよび質量スペクトル測定を用いて調べた。RNAアプタマーは、U1Aと複合化されたRNAヘアピン構造への結合向けに、コンセンサス配列を有している。その3D構造を決定した。

【0043】

U1-snRNP-Aタンパク質に特異的なアプタマーをそれ自体公知の手法でフルオレセインで標識した。次いで10 μg/mlタンパク質および色素標識アプタマー(200 μg/ml)を含有したサンプル20 μLをELISAプレートのウェルに入れた。U1Aタンパク質(10 μg/ml)および無色素アプタマー(200 μg/ml)を含有した更に20 μLのサンプルをもう1つのウェルに入れた。照射を波長488 nmのレーザー光で行った。

CAL I処理および未処理サンプルの双方をSDSサンプル緩衝液と混合した。電気泳動を12% SDSポリアクリルアミドゲル上で行った。そのゲルを染色し、U1Aタンパク質に相当するバンドを前記のようにトリプシンで開裂させた。

開裂タンパク質の一部0.3~0.5 μLをMALDI分析に用い、残りをMS/MS分析またはナノES/MSによるデノボ配列決定用にとっておいた。

【0044】

MALDI用に調製するために、開裂タンパク質0.3~0.5 μLをMALDI標的のある蒸着マトリックス/ニトロセルロース表面上5~10%ギ酸の0.3 μL液滴へ液滴として加えた (c.f. 例えばAnal. Chem., 1997, 69, 4741-4750)。次いでMALDI分析を双方のサンプルで直ちに行つた。処理および未処理サンプルについてこうして得られたスペクトルを比較した。スペクトルの差異はタンパク質がCALIにより修飾された領域を示しており、こうして結合領域と連結された残基を特定している。更に、実際のトリプシン開裂の程度を確かめる上で、理論的トリプシンペプチドのリストを用いることが可能である。

RNAリガンドの結合に関してX線構造に基づき既に得られていた結果を確認した (Nature, 1994, 372:432-438)。

【0045】

次いで高分解CALI-MSを行つた。これはタンデムMSおよび部分的デノボ配列決定からなる。こうして、修飾されたアミノ酸とその修飾の性質および程度を調べることができる。タンデムMS (MS/MS) をNature, 1996, 379, 464-469またはBiochem. Soc. Transactions, 1996, 24, 893-896で記載されたように行つた。

N末端U1Aフラグメントのトリプシン開裂により、MALDIで検出されるような質量の減少した配列で、下記フラグメントを生じた。位置とは、その酵素でトリプシン開裂の位置番号に関する。示された範囲は、N末端から始めた酵素のアミノ酸の番号に相当する。下線部分のフラグメントは分子質量の変化を示しており、CALI処理後に修飾されたものに相当する。これらのフラグメントにおけるアミノ酸HisおよびMetは再配列決定で確認されたように修飾されていたが、構造研究と一致しており、そのことから修飾アミノ酸がRNA結合に関与していることは明らかである。

【0046】

N末端U1Aフラグメントのアミノ酸配列は下記のように知られている：

【化1】

1

MAVPETRPNHTIYINNLNEKIKKDELKKSILYAIFSQFGQILDILVSRSLKMRGQA
 FVIFKEVSSATNALRSMQGFPPFYDKPMRIQYAKTDSDIIAKMK

98

N末端U1Aフラグメントのトリプシン開裂で、対応する分子量の下記フラグメントを得た：

位置	下記の範囲	mol. wt.
3	23 - 23	146.2
5	28 - 28	146.2
2	21 - 21	259.3
14	97 - 98	277.4
8	51 - 52	305.4 : Met 51 (観察された新ペ

プチド質量 = 321.4, 337.4)

7	48 - 50	346.4
4	24 - 27	503.5
12	84 - 88	621.7
13	89 - 96	861.9
9	53 - 60	909.1
10	61 - 70	1047.1
11	71 - 83	1603.9 : Met 72 : Met 82

(観察された新ペプチド質量 = 1619.9, 1635.9, 1651.9, 1667.9)

6	29 - 47	2170.5
1	1 - 20	2354.7 : His 10 (観察された新ペ

プチド質量 = 2370.7)

【0047】

フリーラジカルが酸化を行うことが示された。そのため、上記アミノ酸の酸化は酸化状態に応じて各修飾アミノ酸で 16 da の質量増加をもたらしたが、但し Met では 32 da の増加である。修飾アミノ酸はタンパク質の RNA 結合部位

近くにあり、そのためRNAの結合部位を示す構造研究と一致している。

【0048】

図5および6はN末端U1AフラグメントのトリプシンペプチドのMALDIスペクトルの一部について示している。分子量1603.9のペプチド71-83が示されている。このペプチドのMet72およびMet82はCALIで修飾されているため、1667.9da（2つのスルホン）で質量が得られる。スルホンへの変換のみが図示されている。トリプシン自己分解ピークおよびマトリックスピークを含めたすべての予想されるピークが省略されている。

【0049】

そのスペクトルにおける平均および単同位体ペプチドイオンMH⁺が下記表で示されている：

ペプチド位置	平均MH ⁺	単同位体MH ⁺
89-96	862.96	862.96
53-60	910.10	909.52
61-70	1048.14	1047.54
71-83	1604.89	1603.74
71-83*	1668.89	1667.72
29-47	2171.55	2170.19

* CALI修飾ペプチド

【0050】

MS/MSまたはデノボ配列決定スペクトルは、ペプチド71-83のピーク(MH⁺=1603.74da)のみを示している。MS/MSを親イオンとしてm/z 801.87の二価ピークMH²⁺で行った。単同位体MH⁺ピークがMALDIスペクトルの場合のように観察される。下記表はトリプシンペプチド71-83からのペプチドのリストを示している。トリプシンペプチドはいくつかのYフラグメントイオンを通常示すが、これはカルボニル炭素とアミド窒素とのアミノ酸結合の開裂に起因したC末端イオンである。ロイシンおよびイソロイシンは同一質量を有しており、区別しえない。プロリンのC末端側におけるYイオンは弱いシグナルを出すか、または全く存在しないが、プロリン自体を含む下

記Yイオンは顕著なシグナルを出す。

【0051】

N末端U1Aフラグメントのトリプシンペプチド71-83のデノボ配列決定における単同位体MH⁺ピーク（部分リストのみ）

Ynイオン	そのイオンの配列	MH ⁺ (CALI前)	MH ⁺ (CALI後)
1	R	175.12	175.12
2	MR	306.16	338.15
3	PMR	403.21	435.20
4	KPMR	531.31	563.30
5	DKPMR	646.33	678.32
6	YDKPMR	809.40	841.39
7	FYDKPMR	956.47	988.46
8	PFYDKPMR	1053.52	1085.51
9	FPPFYDKPMR	1200.59	1232.58
10	GFPFYDKPMR	1257.61	1289.60
11	QGFPFYDKPMR	1385.67	1417.66
12	MQGFPFYDKPMR	1516.71	1580.69
13	SMQGFPFYDKPMR	1603.74	1667.72

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はタンパク質において機能性部位を同定するためのスキームを示す。

【図2】

本発明による方法を実施するための装置を示す。

【図3】

β-ガラクトシダーゼからのトリプシンペプチドの部分MALDIスペクトルを示す。

【図4】

β-ガラクトシダーゼからのトリプシンペプチド478-506のMS/MSを示す。

【図5】

N末端U1Aフラグメントのトリプシンペプチドの部分MALDIスペクトルを示す。

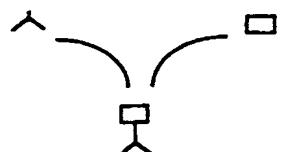
【図6】

N末端U1Aフラグメントのトリプシンペプチド71-83のMS/MSを示す。

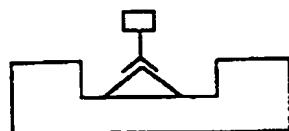
【図1】

タンパク質における機能性部位の同定の概略図

1. tagによる選択LBPの標識



2. LBP-tagとリガンドとの結合



3. 複合体へのレーザー照射又は無照射



4. LBP-tagからリガンドの分離

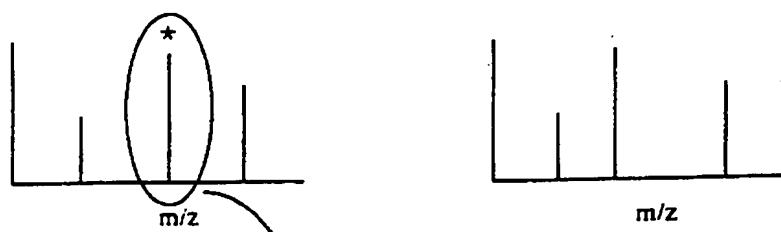


【図1-1】

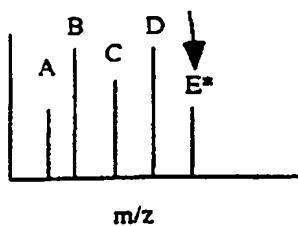
5. ペプチドフラグメントへのリガンドの開裂



6. 修飾ペプチド断片の質量スペクトル測定及び同定



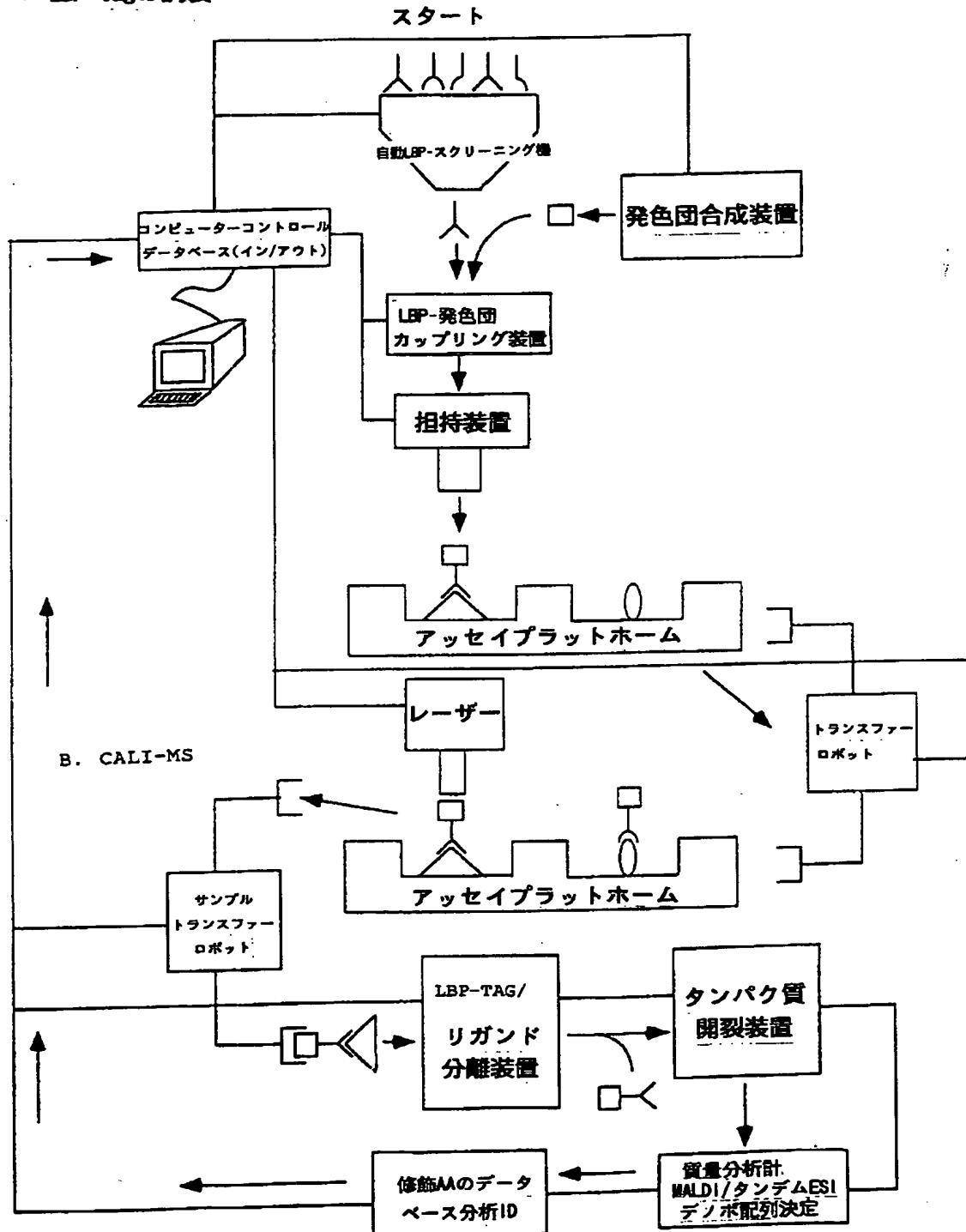
7. 修飾ペプチドフラグメントのデノボ配列決定及び修飾アミノ酸の同定



【図2】

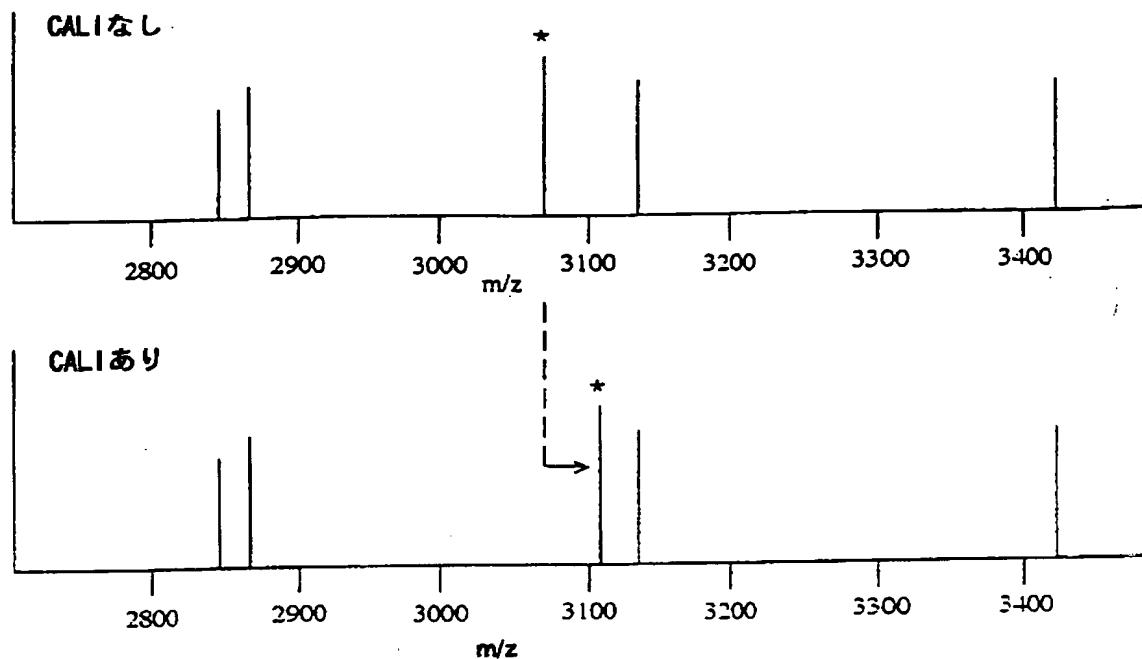
CALIを行うための装置

A. LBP-tagの調製



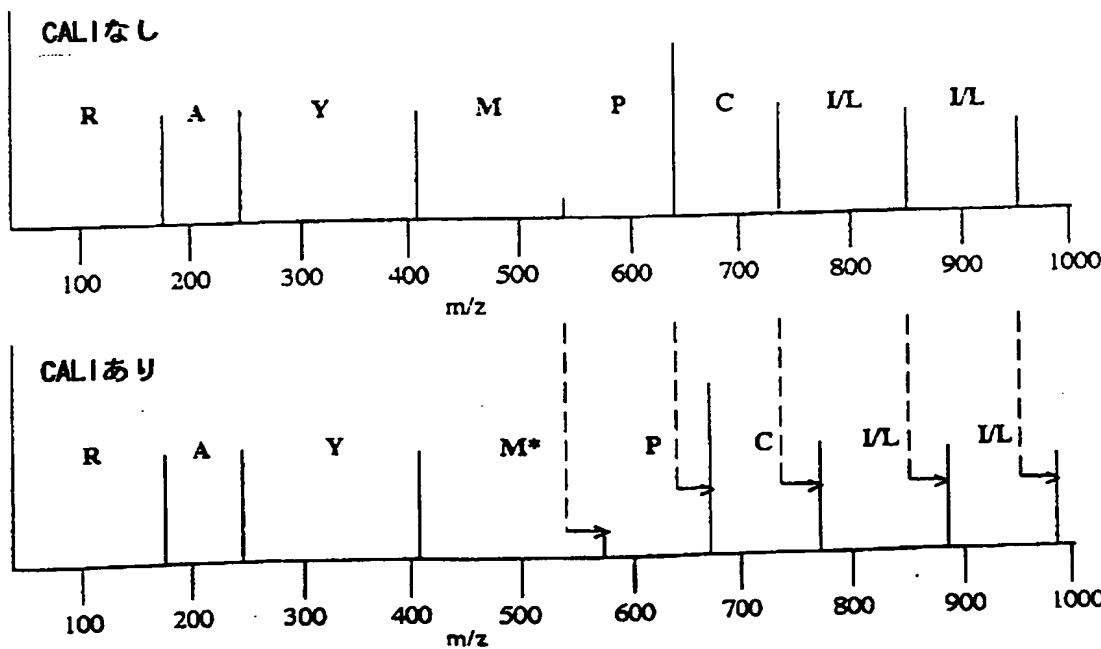
【図3】

β -ガラクトシダーゼからのトリプシンペプチドの部分MALDIスペクトル



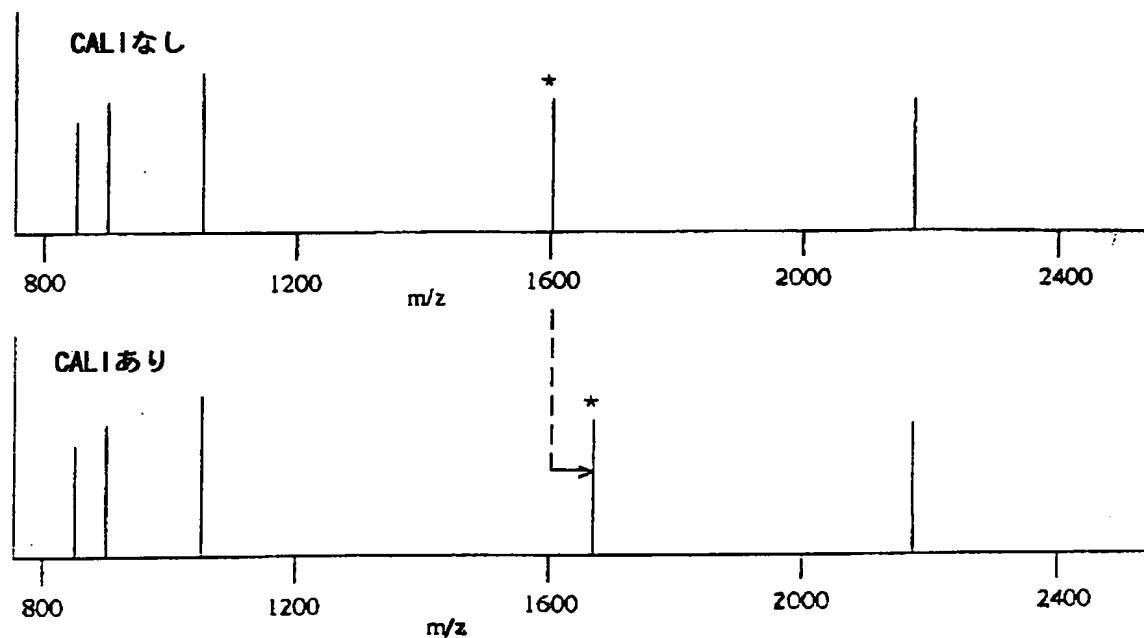
【図4】

β -ガラクトシダーゼからのトリプシンペプチド478-506のMS/MS

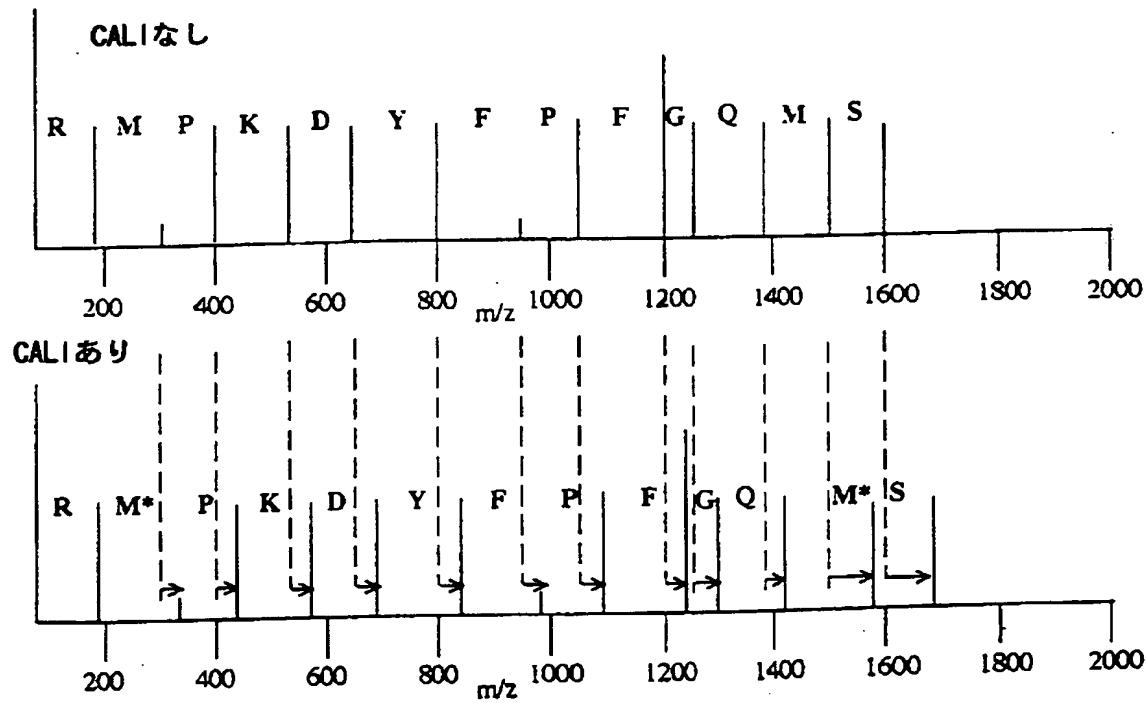


【図5】

N末端U1Aフラグメントのトリプシンペプチドの部分MALDIスペクトル



【図6】
N末端U1Aフラグメントのトリプシンペプチド71-83のMS/MS



M* = 修飾メチオニン

【手続補正書】

【提出日】平成14年4月22日(2002.4.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正内容】

【発明の名称】 タンパク質において機能性部位を修飾および同定するための方法

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

a) 標的タンパク質をレーザー活性化マーカー(tag)へ連結された結合パートナー(BP-tag)と接触させて、標的タンパク質およびBP-tagの複合体を形成させ、

b) 標的タンパク質およびBP-tagの複合体にレーザー光を照射して、結合部位で結合標的タンパク質を選択的に変えるフリーラジカルを発生させ、および

c) タンパク質の選択的に変化した領域がタンパク質開裂および質量スペクトル測定の組合せにより同定される

ことで特徴づけられる、タンパク質で1以上の機能性部位を同定するための方法

。

【請求項2】

タンパク質の選択的に変化した領域がデノボ(de novo)配列決定により更に同定される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

タンパク質向けの結合パートナーが、dsFv、scFv、Fab、抗体、免疫グロブリン様分子、ペプチド、RNA、DNA、PNAおよび小さな有機分子から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

結合パートナーが組合せバンクから誘導される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

レーザー活性マーカーがタンパク質へ結合しうる物質であり、レーザー光照射でフリーラジカルを生じる、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

マーカーが、AMCA-S、AMCA、BODIPYおよびその変種、Cascade Blue、CI-NERF、ダンシル、ジアルキルアミノクマリン、4'，5' -ジクロロ-2'，7' -ジメトキシフルオレセイン、DM-NERF、エオシン、エオシンF3S、エリトロシン、ヒドロキシクマリン、Isosulfan Blue、リサミンローダミンB、マラカイトグリーン、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、NBD、Oregon Green 488、500、514、PyMPO、ピレン、Rhodamine 6G、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Rhodol Green、2'，4'，5'，7' -テトラブロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン、Texas RedまたはX-ローダミンである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

タンパク質開裂が化学的にまたは酵素で行われる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

質量スペクトル測定がタンデム質量スペクトル測定、MALDI-TOFである、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

タンパク質で機能性部位を同定するために用いうる集積独立ユニット／パートの自動システムであって、下記構成：

- 特定の標的分子／リガンドに対する特異的LBPを生じるための自動LBPスクリーニング機
- 発色団を生産するための発色団合成装置
- 選択されたLBPおよび合成された発色団を連結するためのLBP-発色団カップリング装置
- アッセイプラットホームにおいて標識分子／リガンドでコートされた既定ウェ

ル中へLBP-tagを移すための担持装置

- アッセイプラットホームをレーザーシステムへ運ぶためのトランスマーカーロボットアーム
- サンプルをLBP-tag/リガンド分離装置へ運ぶためのサンプルトランスマーカーロボット
- タンパク質開裂装置
- 質量分析計
- データベース
- 中央コンピューターシステム

を含んでなる、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法を行うための装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、標的タンパク質で機能性部位の特異的修飾および同定のための方法に関する。タンパク質中における特定のアミノ酸およびそれらの機能またはタンパク質の機能の喪失/獲得に際するリガンド結合部位としてのそれらの機能と、その後における修飾アミノ酸の決定(エピトープマッピング)との間には、相関関係がある。その方法は、発色団介助レーザー不活化(CALI)および質量スペクトル測定またはタンパク質配列決定の組合せ使用に基づいている。本発明はこの方法を行うための装置にも関する。

【0002】

組換えDNAおよびタンパク質調製の技術によれば、簡単に、タンパク質構造とタンパク質機能との関係を深く理解することができる。ランダム変異誘発の方法、特定の遺伝子選択およびスクリーニング方法は、タンパク質レベルで情報を迅速に得られるが、タンパク質の特定機能性ドメインがアミノ酸置換に対して非常に寛容であり、一部の変異誘発試薬が特定のDNA配列を優先的に攻撃して、可能な変異が制限されるという欠点を有している。そのため、これらの方法で得られる情報も限定されてしまう。

【0003】

例えばアラニンスキャニング変異誘発法のような、別の部位特異的変異誘発法

では、生物学的機能にとり重要なアミノ酸を同定するより直接でより具体的な手法を提供する。この方法ではアラニンへの各アミノ酸の系統的変異があり、機能が決定される。機能の各喪失が特定のアミノ酸と関連づけられる。この技術は、関連した三次元構造も未知の機能性ドメインもないタンパク質へ適用しうる。加えて、これは各場合に1アミノ酸のみの修飾に限定され、それが複数のアミノ酸からなる特定の機能を検出しえない理由となっている。加えて、その方法は分子サイズが増すほど複雑になる。これは病氣に関連した遺伝子産物の機能を分析する際の欠点であり、それはこれらが大抵多数構造ドメインを含んだ大きなタンパク質だからである。

【0004】

更に、他の組換えDNA技術もエピトープマッピングおよびリガンド結合部位マッピングに用いられ、そこでは変異がDNAレベルで導入されたランダム抗原フラグメントの発現がある (c f. J. Immunol. Meth., 141, 245-252, 1991; J. Immunol. Meth., 180, 53-61, 1995; Virology, 198, 346-349, 1994)。最近、ランダムペプチドライブラリーのファージディスプレーがエピトープマッピングに用いられた (J. Immunol., 153, 724-729, 1994; PNAS, 93, 1997-2001, 1996)。

【0005】

タンパク質の別なエピトープマッピング法は、選択ペプチドの高速自動合成 (J. Endocrinol., 145, 169-174, 1995) および組合せペプチドライブラリーの使用 (FEBS Letters, 352, 167-170, 1994) である。これらの方法は線状エピトープには信頼できるが、それらは非線状または不連続エピトープにはうまくいかなかった。オーバーラップペプチドを用いる別法も、不連続エピトープには不満足であった。これはELISAによりリガンドとの結合性について個々のペプチドまたはペプチド混合物をスクリーニングしており、遊離および結合ペプチドはそのリガンド (例えば、抗体) に対して競合する。しかしながら、この方法は煩雑で時間がかかる。

【0006】

もう1つのアプローチではタンパク質修飾および質量スペクトル測定の組合せを用いた (Anal. Biochem., 196, 120-125, 1991)。ここではリガンドがレセプター

へ結合されて、その複合体が無水酢酸で修飾され、リジン残基のアセチル化をもたらす。2タンパク質のタンパク質分解混合物が質量スペクトル測定で分析され、未処理複合体からの対応フラグメントと比較される。修飾されたリジンは容易に検出されるが、これらのリジンはその複合体で保護されておらず、未修飾リジンはリガンドとレセプターとの相互作用のうち一部に関与する。そのため、この技術はリジン残基が関与する相互作用に限定される。もう1つの方法は異なるタンパク質分解に基づき (Protein Science, 4, 1088-1099, 1995) 、タンパク質分解をうけやすい部位は複合体形成後にプロテアーゼ抵抗性になる。

【0007】

抗体に結合したペプチド抗原からのパターンと比較する、遊離ペプチド抗原のタンパク質分解産物の質量スペクトル測定による同定の記載もみられた。その同定は²⁵²Cf プラズマ脱着質量スペクトル測定により行った (PNAS, 87, 9848-9852, 1990)。免疫沈降およびマトリックス介助レーザー脱着質量スペクトル測定 (MALDI-MS) の組合せの記載も更にみられた (PNAS, 93, 4020-4024, 1996)。ここでは、抗原タンパク質が小さなフラグメントへ開裂されて、対象の抗体と沈降される。免疫沈降したペプチドがMALDI-MSで同定されて、抗体結合領域が決定される。この方法では、アフィニティキャピラリー電気泳動によるタンパク質開裂ペプチドの分離および電子スプレー質量スペクトル測定 (ACE-MS) による同定もあった (Anal. Chem., 69, 3008-3014, 1997)。ペプチド混合物の注入に次いで、抗体の注入が行われる。その抗体と結合するペプチドは捕捉されるため、移動しない。結合ペプチドは、そのペプチドでエピトープ残基を決定するために、消去式スクリーニング法で調べられる。しかしながら、この技術は線状エピトープに限定され、不連続エピトープには適用しない。

【0008】

このように、本発明は記載された先行技術の問題を解消する目的に基づいている。その意図は、いかなるタンパク質のいかなる機能性部位も同定しうる方法を提供することである。好ましくは、リガンド相互作用に関与する部位、およびエピトープを同定しうることが意図されている。特に、本発明による方法はタンパク質の三次元構造の知識なしに非線状および不連続エピトープへ適用しうるべき

である。分子を不活化せずにタンパク質機能の決定が可能になることも、本発明により意図されている。その方法が使用上簡単で、迅速に行われ、自動化しうることも、更に意図されている。本発明による方法を簡単に行える装置を提供することも、更に意図されている。

【0009】

この目的は、

- a) 標的タンパク質をレーザー活性化マーカー (tag) へ連結された結合パートナー (BP - tag) と接触させて、標的タンパク質およびBP - tagの複合体を形成させ、
- b) 標的タンパク質およびBP - tagの複合体にレーザー光を照射して、結合部位で結合標的タンパク質を選択的に変えるフリーラジカルを発生させ、および
- c) タンパク質の選択的に変化した領域をタンパク質開裂および質量スペクトル測定の組合せにより同定する

ことで特徴づけられる、タンパク質で1以上の機能性部位を同定するための方法、並びにその方法を行うための装置により達成される。

【0010】

意外にも、C A L I 技術と質量スペクトル測定との組合せにより、タンパク質で機能性部位の信頼しうる迅速な同定を行えることがわかった。本発明によると、標的タンパク質はそれを不活化するためにC A L I により修飾される。次いで、そのタンパク質の修飾領域が質量スペクトル測定により決定される。タンデムMSおよび／またはデノボ (de novo) 配列決定が好ましくは用いられる。これは、アミノ酸およびその生物学的機能の相関づけを、簡単な手法で行える。構造および機能のこの相関は、例えば、特定の代謝活性と分子中それに対応する部位との相関、病変したタンパク質、癌促進タンパク質などについて、情報をもたらす。望ましくない（例えば病的）タンパク質を不活化することも特に可能である。

【0011】

標的タンパク質は、複合体形成が生じてもそのタンパク質が変性されないよう

な条件下で、最初に結合パートナーと接触される。理想的には、その条件はタンパク質の細胞環境の生理学的条件に対応する。結合パートナーはレーザーで活性化しうるマーカーへ連結される。レーザー活性化マーカーは、結合パートナー、即ちアミノ酸配列との共有または非共有結合に適したいずれかのマーカーであって、フリーラジカルを発生しうるように活性化しうる。そのマーカーは好ましくはレーザー光で活性化されるが、ペルオキシダーゼ（過酸化水素／セイヨウワサビペルオキシダーゼ系）でも可能である。このようなマーカーの例は、AMCA-S、AMCA、BODIPYおよびその変種、Cascade Blue、C1-NERF、ダンシル、ジアルキルアミノクマリン、4'，5' -ジクロロ-2'，7' -ジメトキシフルオレセイン、DM-NERF、エオシン、エオシンF3S、エリトロシン、ヒドロキシクマリン、Isosulfan Blue、リサミンローダミンB、マラカイトグリーン、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、NBD、Oregon Green 488、500、514、PyMPO、ピレン、Rhodamine 6G、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Rhodol Green、2'，4'，5'，7' -テトラブロモスルホンフルオレセイン、テトラメチルローダミン、Texas RedまたはX -ローダミンである。マーカーは好ましくはマラカイトグリーンイソチオシアネート、フルオレセインイソチオシアネートまたは4'，5' -ビス(1,3,2 -ジチオアルソラン-2 -イル)フルオレセインである。照射は、特定の発色団により吸収される波長のレーザー光で行う。

【0012】

結合パートナーは、適切なタンパク質向けとして、いかなる結合パートナーであってもよい。それは好ましくはscFv、Fab、抗体(diabody)、免疫グロブリン様分子、ペプチド、RNA、DNA、PNAまたは小さな有機分子である。

【0013】

結合パートナーは好ましくは組合せライブラリーから誘導される。これはいかなる組合せライブラリーでもよく、例えばタンパク質ライブラリー、ペプチドライブラリー、cDNAライブラリー、mRNAライブラリー、有機分子とのライブラリー、免疫グロブリンスーパーファミリーとのscFvライブラリー、タン

パク質ディスプレーライブラーなどである。以下がライブラリーの例示である：全タイプのタンパク質、例えば構造タンパク質、酵素、レセプター、リガンド、修飾を含めた全タイプのペプチド、DNA、RNA、DNAおよびRNAの組合せ、ペプチドとRNAまたはDNAとのハイブリッド、全タイプの有機分子、例えばステロイド、アルカロイド、天然物質、合成物質など。様々なもの、例えばファージディスプレー系（例えばM13、f1、fdなどのような纖維状ファージ、λファージディスプレー、ウイルスディスプレーなど）での提示、細菌表面、リボソームなどでの提示が行える。

【0014】

CALI技術を用いて、標的タンパク質が直接かつ特異的に不活化される（PNAS, 85, 5454-5458, 1988; Trends in Cell Biology, 6, 442-445, 1996参照）。CALIは、抗体または他のリガンドのような結合試薬を機能阻止分子へ変換するために用いられる。ここでは、結合パートナー（BP）が例えば色素マラカイトグリーン（MG）へ連結される。細胞成分により有意に吸収されない波長のレーザー光による照射で、この色素はフリーラジカルを発生する。この測定のために、MGへ連結されたBP（=BP-MG）が対象のタンパク質サンプルと共にインキュベートされる。不活化すべき領域が選択され、620 nmのレーザービームで照射される。この光はMGにより吸収されて、不可逆的化学修飾のために15 Åの半径でBP-MGへ結合されたタンパク質を選択的に不活化する短命のフリーラジカルを発生する。この系はインビトロおよびインビボアッセイと細胞内および外の標的分子に用いることができる。

【0015】

次いでこうして不活化されたタンパク質が開裂される。この目的のためには、残基、例えばLys-C、Glu-C、Asp-Nの後で特異的に開裂するプロテアーゼを用いることが可能である。その例はトリプシン、キモトリプシン、パパインなどである。化学的開裂は、例えば臭化シアン（Metに特異的）、3-ブロモ-3-メチル-2-（2-ニトロフェニルメルカプト）-3H-インドール（BNPS-スカトール；Trpに特異的）、2-ニトロ-5-チオシアナト安息香酸（Cysに特異的）およびFe-EDTAでも可能である。

【0016】

開裂混合物は電気泳動により分別される。次いで、質量スペクトル測定および未処理標的タンパク質との比較により、修飾アミノ酸を評価することが可能である。

【0017】

質量スペクトル測定で極めて最近の進展からタンパク質の迅速な同定をもたらした (PNAS, USA, 93, 14440-14445, 1996)。標的タンパク質が CAL I により不活化されるとすぐに、タンデム質量スペクトル測定、適切であればデノボ配列決定により、不活化おそらく関与している不活化タンパク質の修飾アミノ酸を特定することができる (Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1015-1024, 1997; Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1067-1075, 1997)。

【0018】

結合パートナーと本発明に従い複合化されたタンパク質の同定は、タンパク質開裂および質量スペクトル測定、適切であればデノボ配列決定の組合せにより行われる。

これにはこうして処理されたタンパク質を必要とし、マーカーを電気泳動またはクロマトグラフィーにより標的タンパク質から最初に分離して用意される。次いで単離および修飾されたタンパク質は、上記の方法により化学的にまたはタンパク質分解で開裂される。これはゲルで（即ち、分離後にゲルから標的タンパク質の直接溶出、その後タンパク質分離）または溶液で行える。ゲルでの開裂方法は公知であり、例えばAdvanced Methods in Biological Mass Spectrometry, EMB L-Laboratory, Heidelberg, 1997またはShevchenko, A., et al., Anal. Chem., 68:850-858, 1996で記載されている。

MALDI分析はそれ自体公知の手法で行われる。

【0019】

ナノ電子スプレー分析 (nanoES) では、ゲル破片からトリプシンペプチドを抽出することが必要である。これをするためには、ゲル破片が重炭酸アンモニウム、アセトニトリル、希ギ酸およびアセトニトリルで連続的に洗浄される。上澄が合わされ、真空遠心機で乾燥される。サンプルが 80% 強度ギ酸に溶

解され、水で速やかに希釈され、その後脱塩される。

【0020】

質量スペクトル測定による分析は、それ自体公知の様々な手法で、例えば、ナノ電子スプレー (Wilm. M. and Mann, M., *Anal. Chem.* 68, 1-8, 1996) 、マトリックス介助レーザー脱着およびイオン化 (M A L D I) (Siuzdak, G. *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press Inc. 1996) を含めた電子スプレーのようなイオン化源を用いて (Chapman, J. R., et al., *Methods in Molecular biology*, 61, JR Chapman editor, Humana Press Inv. Totowa NJ, USA, 1996) 、またはトリプル、四重極、飛行時間型、磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴および四重極イオン捕捉のような質量分析の組合せを用いて行える。

【0021】

開裂混合物のペプチドがタンパク質で調査部位を特定する上で疑義のない確定にとり不十分であるならば、それ以上の配列情報が、質量分析計で更なるフラグメント化により、例えばM A L D I - T O F、MS/MS (タンデム質量スペクトル測定) 、MSⁿで対象箇所の下流における分解により得られ、そのタンパク質がデノボ配列決定で更に同定される。

【0022】

C A L I では、標的タンパク質のあるアミノ酸で光化学修飾があるため、MS はどのアミノ酸がどのように修飾されたかを特定するために2段階で用いられる。その方法は低および高分解能で行える。

低分解能では、タンパク質のセグメントが修飾されたペプチド質量マッピングにより調べることが第一に可能である (*Anal. Chem.*, 69, 4741-4750, 1997; *Biochem. Soc. Transactions*, 24, 893-896, 1996; *Anal. Chem.*, 69, 1706-1714, 1997)。第二段階では、それより高い分解能で、選択されたペプチドでタンデム質量スペクトル測定および/またはデノボ配列決定が修飾部位を調べるために用いられる。どの特定アミノ酸がC A L I で修飾されたかを調べるには、0~0.03 ドルトンの質量を解析しうる質量分析計の配置で可能である (*Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11, 1015-1024) (q Q T O F および他の質量分析) ; 質量の増減から修飾のタイプを調べることさえ可能である。

【0023】

CAL Iにより生じるフリーラジカルは、His、Met、CysおよびTrpのような酸化感受性アミノ酸側鎖の修飾を行う。他のアミノ酸側鎖の修飾もありうる。酸素が付加されるため、これは質量にかなりの変化をもたらす。CAL I処理フラグメントおよび未処理サンプル間の開裂後におけるペプチドフラグメントの比較で、修飾アミノ酸の大体の位置決めを行える。これらのアミノ酸はデノボ配列決定で更に正確に特定される。

【0024】

修飾の種類そのものを知ることは不要である。本発明による方法では、処理および未処理サンプル間の差異から、修飾を見分けられる。この方法の利点は、タンパク質の三次元構造が未知であっても、不連続エピトープを明らかにする上で用いることである。

CAL Iにより誘導された修飾は、分析の速度を上げる親イオンスキャン (J. Mass Spectrom. 32, 94-98, 1997) のような他の方法を用いることで解明してもよい。これはCAL Iにより変化したペプチドのみを検出する。

不十分な情報が限定されたペプチドフラグメント化または疑わしい質量測定のせいで得られるならば、デノボ質量配列決定を行うことが可能である (Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 1015-1024, 1997)。この方法では、ペプチドは¹⁸⁰で標識される。これは、マイクロ蒸留で精製された50% (vol/vol) H₂¹⁸⁰を含有する開裂用緩衝液において、ゲルでトリプシン開裂することにより行われる。QqTOF質量分析計が好ましくは用いられる。明白な結果は1:1¹⁶⁰/1⁸⁰比によるダブルエットを読むことで可能である。そのダブルエットの質量差が特定ペプチドの変化状態の指標となる。異なる電荷状態を用いて、所定ペプチドに関する配列で15以内のアミノ酸を読み取ることができる。未処理およびCAL I修飾タンパク質の¹⁸⁰標識スペクトルの比較から、修飾アミノ酸について疑義のない情報を得る。

【0025】

図1はタンパク質において機能性部位を同定するためのスキームを示す。

本発明は本発明による方法を行うための装置にも関する。これは図2で示され

ている。この装置は集積独立ユニット／パートの自動システムであり、タンパク質で機能性部位を同定するために用いられる。パートAはLBP-tagの調製に関する。自動LBPスクリーニング機は特定の標識分子／リガンドに対する特異的LBPを選び出し、発色団合成装置は選択された発色団を生産する。選択されたLBPおよび合成された発色団はLBP-発色団カップリング装置で化学的に連結されて、LBP-tagを生じる。このLBP-tagは担持装置中へ移して、アッセイプラットホームにおいて標識分子／リガンドでコートされた既定キャビティ中へLBP-tagを移す。

【0026】

次いでトランスファーロボットが、第二パートBを開始させるために、アッセイプラットホームをレーザーシステムへ運ぶ。サンプルは、フリーラジカルによる修飾を誘導するために、必要な波長でレーザー照射される。次いで照射されたサンプルは、リガンドを単離するために、サンプルトランスファーロボットによりLBP-tag／リガンド分離装置へ移される。次いでリガンドがタンパク質開裂装置で開裂される。次いでペプチドフラグメントが、質量の変化を検出するために、または直接配列決定を行うために、質量分析計で分析される。次いで質量スペクトルからのデータがデータベースで分析のために用いられて、最終的にアミノ酸またはペプチドフラグメントの同定を行える。装置のすべてのパートが、コントロールおよび分析用の中央コンピューターシステムに接続されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はタンパク質において機能性部位を同定するためのスキームを示す。

【図2】

本発明による方法を実施するための装置を示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

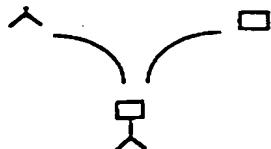
【補正方法】変更

【補正内容】

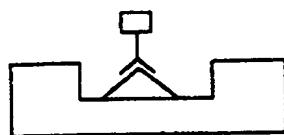
【図1】

タンパク質における機能性部位の同定の概略図

1. tagによる選択LBPの標識



2. LBP-tagとリガンドとの結合



3. 複合体へのレーザー照射又は無照射



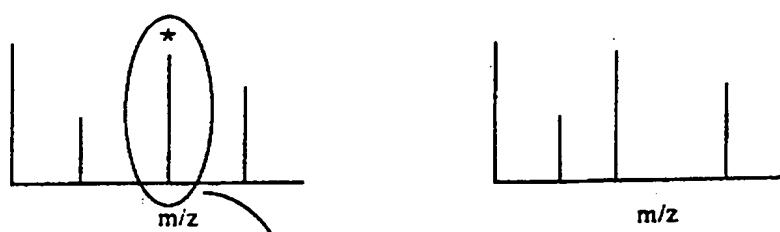
4. LBP-tagからリガンドの分離



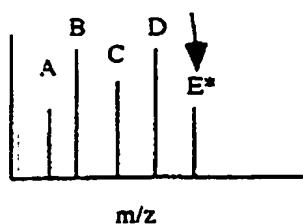
5. ペプチドフラグメントへのリガンドの開裂



6. 修飾ペプチド断片の質量スペクトル測定及び同定



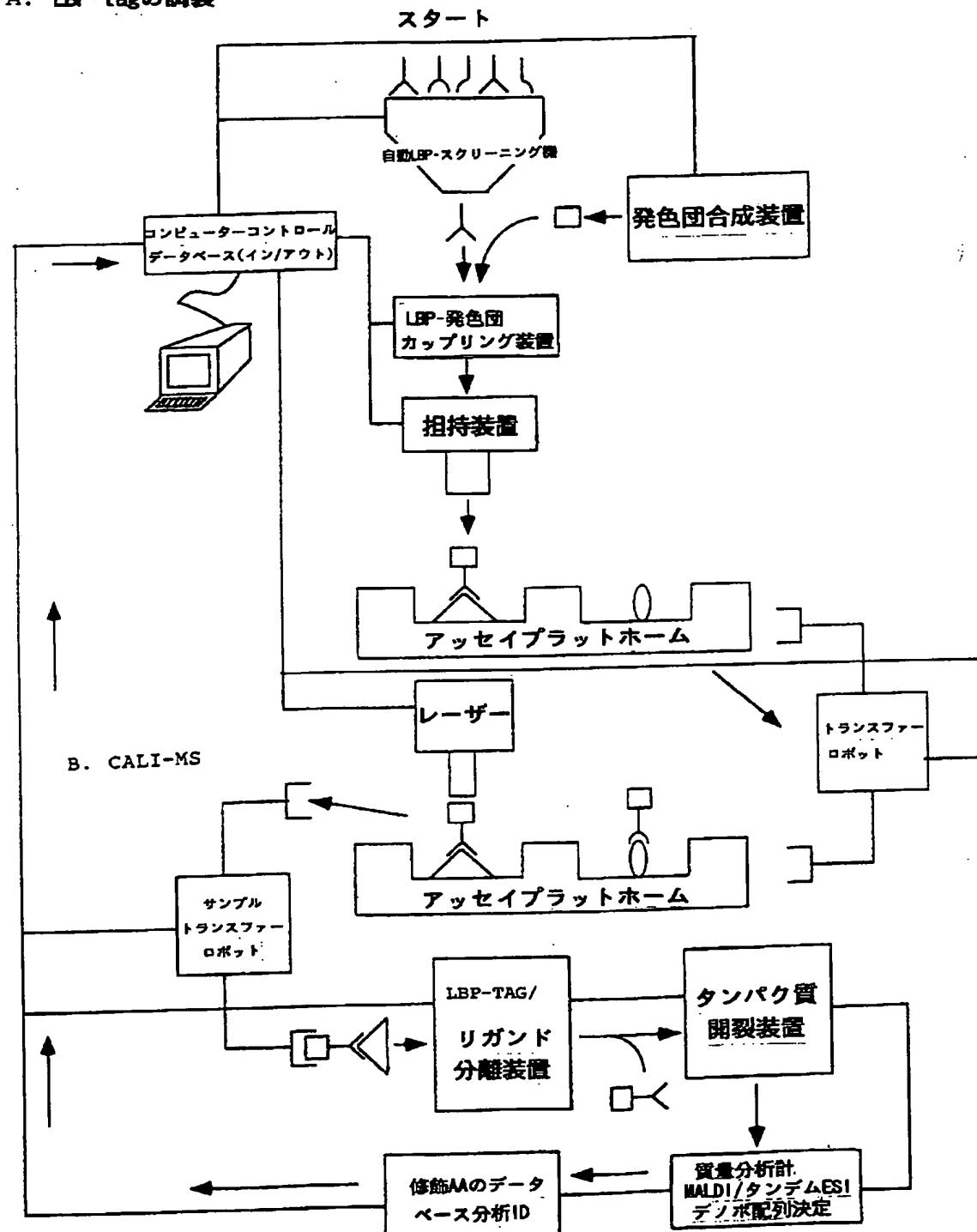
7. 修飾ペプチドフラグメントのデノボ配列決定及び修飾アミノ酸の同定



【図2】

CALIを行うための装置

A. LBP-tagの調製



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/09052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N33/68 601N33/533		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 99 41607 A (HOFFMANN DANIEL ;GMD FORSCHUNGSZENTRUM INFORMAT (DE)) 19 August 1999 (1999-08-19) page 10, line 31 -page 13, line 26; claim 1; figures 1A,1B ---	1~9
P,A	HEGYI, GYOERGY ET AL: "Intrastrand Cross-Linked Actin between Gln-41 and Cys-374. I. Mapping of Sites Cross-Linked in F-actin by N-(4-azido-2-nitrophenyl) Putrescine" BIOCHEMISTRY (22-12-1998), 37(51), 17784-17792, XP002132757 ---	1 ---
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the International search report	
10 March 2000	14/04/2000	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-2016	Authorized officer Hart-Davis, J	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/09052

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JAY D G: "SELECTIVE DESTRUCTION OF PROTEIN FUNCTION BY CHROMOPHORE-ASSISTED LASER INACTIVATION" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, vol. 85, no. 15, August 1988 (1988-08), pages 5454-5458, XP000857275 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1
A	WANG FENG-SONG; JAY DANIEL G: "Chromophore-assisted laser inactivation (CALI): Probing protein function in situ with a high degree of spatial and temporal resolution" TRENDS IN CELL BIOLOGY, vol. 6, 1996, pages 442-445, XP000890066 cited in the application the whole document	1
A	BEERMANN ANKE E L; JAY DANIEL G: "Chromophore-assisted laser inactivation of cellular proteins" METHODS IN CELL BIOLOGY, vol. 44, 1994, pages 715-732, XP000889671 cited in the application	1
P,A	WO 99 20190 A (HARVARD COLLEGE ; JAY DANIEL G (US)) 29 April 1999 (1999-04-29) the whole document	1
A	R F STEINER, S ALBAUGH, C FENSELAU, C MURPHY, M VESTLING: "A Mass Spectrometry Method for Mapping the Interface Topography of Interacting Proteins, Illustrated by the Melittin-Calmodulin System" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 196, 1991, pages 120-125, XP002132758 cited in the application the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/09052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9941607 A	19-08-1999	NONE	
W0 9920190 A	29-04-1999	NONE	

フロントページの続き

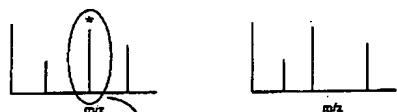
(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	マーク (参考)
G O 1 N	27/62	G O 1 N	33/53
	33/53		33/566
	33/566		33/483
// G O 1 N	33/483	27/26	Z
			315K
(72) 発明者	ジョスリン、エイチ、ヌグ		
	ドイツ連邦共和国ミュンヘン、ヒルシュ-		
	ゲロイト - シュトラーセ、56		
F ターム (参考)	2G045 AA34 AA40 DA36 FA12 FB01		
	FB02 FB03 FB07 GC30		
	4B029 AA07 BB15 CC01 FA03		
	4B063 QA01 QA11 QQ79 QR16 QR66		
	QS03 QS28 QS36 QX01		

【要約の続き】

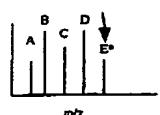
5. ベブチドフラグメントへのリガンドの開裂



6. 修飾ペプチド断片の質量スペクトル測定及び同定



7. 修飾ペプチドフラグメントのデノボ配列決定及び修飾アミノ酸の同定



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.